Omaggio

S 152

Studi complementari

SULLA

REAZIONE FERRICA DEL GLOBULO ROSSO

PEL

Prof. ***ANGELO PETRONE***
della R. Università di Catania

Estratto dagli Atti della R. Accademia Medico-Chirurgica di Napoli
Anno LVI. — N. II.

NAPOLI
TIP. ED. TOCCO & SALVIETTI
S. PIETRO A MAIELLA, 34.
1902.

Studi complementari

SULLA

REAZIONE FERRICA DEL GLOBULO ROSSO

PEL

Prof. ***ANGELO PETRONE***
della R. Università di Catania

Estratto dagli Atti della R. Accademia Medico-Chirurgica di Napoli
Anno LVI.—N. II.

NAPOLI
TIP. ED. TOCCO & SALVIETTI
S. PIETRO A MAIELLA, 34.
1902.

Avrei dovuto da circa 2 mesi fare la presente comunicazione a questa illustre Accademia, a cui ho l'onore di appartenere: ma il mio turno non era ancora arrivato, ed ho atteso fin oggi, pur potendo comunicare altrove, per un obbligo morale verso i maestri e colleghi quì presenti, i quali con nobili espressioni incoraggiarono le mie ricerche sul sangue nell' adunanza del luglio passato; e per scagionarmi dai gravi addebiti fattimi dal collega G. Boccardi nella sua comunicazione fatta il 2 scorso febbraio a questa stessa Accademia, quando io non era *presente* alla seduta nel tempo della sua comunicazione, fondandosi principalmente sulle ricerche fatte dal dottor Orsi sotto la sua direzione nel laboratorio di Anatomia e pubblicate nell' Arte medica. Anno VI, n. 7. " *Intorno la reazione del Petrone sul sangue* ".

Nella prima serie dei preparati esposti avrete potuto osservare la reazione ferrica nel globulo rosso dei mammiferi e degli ovipari mediante l'alcool solforoso, così come io precedentemente otteneva con l' alcool solforico, e specialmente con l' alcool solforico e percloruro di ferro. Da questi risultati si conferma che la reazione ferrica, non so finora chiamarla diversamente, è una *reazione intima* che si ottiene senza l'aggiunta artificiale del ferro: e questo nuovo prodotto prima amorfo, poi cristallino, di color più cupo di quello ottenuto coll'acido solforico, sta evidentemente nel corpicciuolo dell'emasia dei mammiferi e propriamente nel suo nucleo trasformato, ovvero nel nucleo del globulo rosso degli ovipari.

Per preparare il reagente, che anche qui si deve far agire sul sangue semplicemente essiccato, o almeno sottoposto ad un

calore che non superi i 65° c., ho adoprato l' anidride solforosa sviluppata dal solfito di soda puro idrato (cristallizzato), o anidro (polveroso), aggiungendovi in una provetta da saggio l' acido cloridrico. Dopo aver fatto la miscela dei 2 reagenti, si chiude la provetta con un turacciolo di sughero, o meglio di caoutchouc forato nel mezzo, ove si fa penetrare la branca verticale corta di un tubo di vetro piegato ad ansa, in modo che le 2 branche verticali fanno angolo retto coll'intermedia orizzontale: la branca verticale più lunga è quella che si fa pescare nella boccetta contenente alcool assoluto. Avendo così pronto tutto l' occorrente, si aiuta lo sviluppo della anidride solforosa facendo leggermente bollire il miscuglio della provetta; e dopo pochi secondi, quando si può essere sicuri che tutta l'aria contenuta nel piccolo apparecchio è stata cacciata fuori dall' anidride solforosa che si sviluppa, come si è avvertiti dal penetrante odore caratteristico e dell' immediato e forte arrossimento della carta di tornasole, accostata all'apertura della branca lunga, allora si tuffa questa nell' alcool della boccetta, sospendendo per poco il riscaldamento della provetta; diversamente le bolle di anidride solforosa nell'alcool vengono numerose e rapide, da non potersi ben misurare al bisogno: diminuendo invece il forte sviluppo e tensione dell'anidride solforosa nell'apparecchio, una volta messo il tubo nell'alcool assoluto, questo tende a salirvi: scaldando allora di nuovo leggermente il fondo della provetta, ricomincia l' ebollizione, aumenta lo sviluppo e la tensione del gas, la colonna di alcool asceso si abbassa e successivamente si sprigionano le bolle di gas solforoso nell'alcool con relativa lentezza in modo da poterle contare: quando basta, si fuoresce il tubo immerso nell'alcool, e dopo si chiude rapidamente la boccetta dell'alcool e si agita: e per non perdere in seguito all' evaporazione il titolo richiesto, deve adoprarsi una boccetta a turacciolo smerigliato, e meglio ancora con contagocce, per non aprire la boccetta ogni volta che deve servire il reagente. Il titolo di questo dev' essere di circa un centimetro cubico di gas in cento di alcool assoluto: in minore quantità l'anidride solforosa dà la reazione più debolmente e lentamente, sino a non darla affatto: se invece si aumenta per poco la dose verso l'alcool, il reagente riesce emolitico in pochi minuti ed il risultato non si ottiene. E siccome io mi sono servito di un tubo, di quelli di cui ci serviamo ordinariamente per far le pipette nella tecnica microscopica, con un diametro nel suo lume di circa 4 millimetri, ed ogni bolla di gas che vi esce è eguale a circa un de-

cimo di centimetro cubico, avendo fatto il paragone con la goccia di acqua che esce dallo stesso tubo, così per ogni 100 centimetri cubici di alcool assoluto abbisognano 10 bolle di gas: io, per non consumare molto alcool assoluto, anche per evitare che una notevole quantità del reagente perdesse la sua forza in tutto il tempo richiesto dal consumo, ne ho preparato ogni volta per 30 centimetri cubici di alcool, impiegandovi 3 bolle di anidride solforosa. Tenendosi strettamente a queste norme di preparazione la reazione si ottiene costantemente, e col reagente ben riuscito si ha la reazione anche dopo un minuto come lo mostrano i preparati esposti così ottenuti, e come si può seguire sotto al microscopio dopo aver messo 3 o 4 gocce del reagente sul coproggetti con lo straterello di sangue, evitando però di far arrivare il proprio alito, nel qual caso succederebbe emolisi.

Il reperto che si ottiene è simile ad allo stesso posto, come ho detto, di quello che aveva dimostrato con l'alcool solforico; soltanto il colorito è più scuro: devo però notare, che il vapore acqueo del proprio alito, o quello dell' ambiente, questo però meno efficacemente, arrivano a sciogliere e far scomparire quei cristalli, così come danno emoglobinolisi, quando la reazione si è ottenuta rapidamente, ed è mancato perciò il tempo per ben coagulare e rendere insolubile l' emoglobina; ed a ciò, come è risaputo, bisognano almeno 2 ore. L' è perciò, che nei tempi freddo-umidi si ottengono difficilmente buoni preparati, se non si fanno restare almeno 2 ore nel reagente. Ed anche così facendo, è utile dopo passare i preparati in alcool assoluto, o in alcool assoluto ed etere, ovvero in alcool e cloroformio, meno per togliere l'anidride solforosa, la quale è in gran parte evaporata, ma per fissare meglio il reperto ottenuto. I lavaggi posteriori in alcool assoluto, ecc., e la permanenza di qualche ora dei preparati nello stesso sono invece necessari, come esporrò in seguito, per i preparati assoggettati all'alcool solforico, non essendo l'acido solforico volatile, ed ispessendosi perciò con l' evaporazione dell' alcool, quando darebbe per la sua avidità di acqua dissoluzione di tutto il contenuto del globulo rosso, anche ben fissato, a causa della forza emolitica notevole della soluzione acquosa, che si forma, dell' anidride solforica.

Nella 2ª serie dei preparati è esposto il risultato positivo della reazione, che costantemente si ottiene adoprando in alcool assoluto al titolo di 1:8000, sia l'acido solforico Erba (densità 1,835), sia

quello di Merck (pro analysi—densità 1,84), sia il puro, giudiziario di Kahlbaum, sia il purissimo di Schering. Il preparato vi deve restare almeno 2 ore, anzi la reazione si ottiene meglio dopo 4 a 6 ore, e si può far restare nel reagente la lastrina anche 20 ore, ma il reperto ordinariamente si attenua ed arriva a scomparire prolungandosi troppo l'azione dell' acido solforico: allora l' emoglobina può restare nel globulo essendo resa insolubile, mentre quel nuovo prodotto può essere scomparso, disciolto dallo stesso reagente, il quale dopo molte ore assorbe più o meno vapore acqueo. Dopo i preparati devono essere, ancora umidi del reagente, immersi in alcool assoluto, o nelle altre 2 miscele anidre fissanti; e dopo 10 a 12 minuti, devono essere ancora per altre 3 o 4 volte lavati per alcuni minuti in solo alcool assoluto allo scopo di allontanare qualsiasi traccia di anidride solforica: se ciò non si fa, anche con la reazione ben riuscita, come si può accertare, osservando al microscopio il preparato ancora umido di alcool solforico, appena comincia l' essiccamento si segue chiaramente sotto il microscopio stesso la dissoluzione progressiva, sotto la forma di vacuolizzazione, dell'emoglobina e della massa cristallina formata: invece lavando ripetutamente il preparato ancora umido dell' alcool solforico in alcool assoluto puro, ecc., la reazione risalta costantemente, e si conserva in modo definitivo, anche se i preparati, dopo asciuttati, saranno esposti al vapore acqueo, o si metteranno in soluzioni acquose, come per lo più è utile fare negli ulteriori trattamenti con le soluzioni acquose di eosina, ecc. Dev' essere, a me pare, l'avidità che ha l'anidride solforica a combinarsi con l'acqua, che obbliga a toglierne le tracce. Bisogna insomma cominciare con l'anidride solforica in un mestruo anidro, alcool assoluto, e poi togliere qualsiasi particella della sostanza avida di acqua sempre con solventi anidri, come l'alcool assoluto, l'etere, il cloroformio, essendo la soluzione acquosa diluita dell' anidride solforica solvente dell' emoglobina e più ancora della massa reazionata: dopo i lavaggi anidri l' acqua aggiunta, non potendo più diventare solforica, rispetta perfettamente il globulo rosso col nuovo reperto ottenuto. Con ciò si giustifica perchè per lo io passato otteneva difficilmente buoni risultati quando impiegava qualità più pure di acido solforico, dovendo essere allora più avido di acqua; e per questo io metto volentieri le attenuanti ai risultati negativi ottenuti dal Boccardi e dall'Orsi, sempre però deplorando la fretta da loro avuta nel conchiudere

recisamente alla negazione del reperto da me ottennto col solo acido solforico.

Confermata così la reazione intima che induce anche l'anidride solforica da sola in quella sostanza centrale del globulo rosso, si conferma la mia opinione primitiva, che, cioè, il percloruro di ferro aggiunto fa ottenere costantemente il reperto, non per l'influenza del ferro, ma perchè ostacola l' emolisi: ed allo stesso modo antiemolitico dovrebbe agire il caoutchouc, di cui parlai nella precedente comunicazione. Con questi risultati costanti ottenuti dall'alcool solforico, impedendo l'azione dell' acqua quando vi è ancora di anidride solforica, si giustificano i risultati positivi, che io tante volte otteneva precedentemente anche con le qualità più pure di acido solforico, ed i risultati negativi, quando per l' emolisi si rovinavano i preparati; però anche in questi ultimi casi imponeva il fatto della reazione avvenuta, ma guastata, trovandosi allora in gran parte quel composto giallo-bruno, frammentato, più o meno granulare e libero, accumulato specialmente alla periferia dello stratarello di sangue. E questi fatti, da me frequentemente osservati e comunicati nelle memorie precedenti, e che avrebbero dovuto generare almeno il dubbio nei miei oppositori, imponevano a me la convinzione, che la reazione doveva ottenersi anche col solo acido solforico, e che bisognava studiare meglio, come dissi nella comunicazione passata, le ragioni dell' incostanza del risultato con le qualità più pure di acido solforico. Con gli stessi risultati si spiega infine il reperto costante che io aveva ottenuto, e che tutti dopo hanno confermato, del coloramento giallo-bruno che si ha della sostanza cromatica che si trova in alcune o in tutte le cellule del sangue (mammiferi, o ovipari), trattando con la soluzione solforica acquosa 1 : 4; risultato, che io ritengo sempre come la dissoluzione di quel composto formato dall' anidride solforica nel corpuscolo rosso, operata dalla soluzione acquosa del reagente, e quindi la consecutiva colorazione della cromatina: mi si disse a Catania da un collega di chimica, e qui a Napoli mi si ripetè da un collega in medicina, che quel reperto di colorazione delle masse cromatiche si doveva invece, secondo la loro opinione, ritenere come una carbonizzazione indotta dall' azione della soluzione molto concentrata di acido solforico: ma ho creduto non ammissibile questa opinione, perchè il corpo di quelle cellule nucleate, e poi tutto il resto della parte corpuscolare non presenta alcuna traccia di carbonizzazione, invece la conservazione più nitida e regolare; che se quella cromatina fosse

carbonizzata, non sarebbe più suscettiva delle ordinarie colorazioni nucleari, le quali invece riescono perfettamente: perchè la supposta carbonizzazione non si avvera nei leucociti, trattando allo stesso modo lo stratarello di sangue privato per mezzo dell'acqua dai corpuscoli rossi: perchè la marcia senza sangue con simile metodo si fissa nel modo più perfetto, e le sue cellule, che pur sono le cellule bianche del sangue, non mostrano alcuna colorazione nel loro nucleo, mentre la colorazione si fa bellissima quando con la marcia vi è misto sangue: perchè infine non si sarebbe potuto giustificare la mancante carbonizzazione in quelle parti, adoperando soluzioni simili concentrate di altri acidi minerali forti, come il nitrico, il cloridrico, i quali allora, come ho già comunicato altra volta, fissano anche bene il sangue, ma non danno alcuna colorazione della sostanza cromatica. E qui devo dichiarare, che questo risultato costante che si ottiene esclusivamente dalla soluzione acquosa concentrata di acido solforico, e che io non poteva riportare a carbonizzazione, da un lato fermava la mia convinzione sulla reazione intima che doveva avvenire nel globulo rosso per l'azione dell'anidride solforica, dall'altro mi incitava sempre più a trovare le ragioni dei risultati incostanti e sovente negativi con le qualità pure di acido solforico.

Perchè ognuno possa ripetere con esattezza la pratica, dirò più esplicitamente il modo come preparare l' alcool solforico. Fo cadere una goccia di acido solforico direttamente dalla boccetta in un' altra, ove aggiungo 10 centimetri cubici di alcool assoluto: così ho una soluzione di 1 a 200: prendo poi un centimetro cubico di questa e vi aggiungo in altra boccetta altri 39 centimetri cubici di alcool assoluto, e così si ottiene la soluzione adatta di 1:8000. Mi par soverchio notare, che non si ottiene l' esatta soluzione, se su una goccia di acido solforico se ne mettono 200 di alcool assoluto, perchè se 20 gocce di acido solforico fanno quasi un centimetro cubico, ce ne vogliono circa 40 di alcool assoluto per riempire la suddetta misura.

Dopo i fatti esposti, che facilmente ognuno potrà ripetere e controllare, mi sento autorizzato a confermare la reazione intima indotta nel corpuscolo rosso dai 2 composti ossigenati acidi dello zolfo, dall' anidride solforica e dall' anidride solforosa: e qui devo dichiarare di nuovo, che dopo altre prove tentate, l' idrogeno solforato non fa ottenere alcun risultato. Quel nuovo composto, che probabilmente si fa in presenza ed a spese del ferro contenuto nel glo-

bulo rosso, è solubile in acqua quando vi è ancora del reagente che ha per radicale lo zolfo: vi resta invece insolubile, se il reagente è allontanano da un solvente anidro, come l'alcool assoluto, l' etere, il cloroformio. E che sia quel composto giallo-bruno cristallino solubile nella soluzione acquosa molto diluita di acido solforico è confermato anche da ciò che comunicai altra volta, di aver ottenuto questa dissoluzione anche con la reazione già fissata ed insolubiie in acqua, assoggettando i preparati per varie ore ad una soluzione acquosa diluita di acido solforico, quando quella massa cristallina scompare in gran parte dai globuli rossi, e va a colorare i nuclei dei corpuscoll bianchi precedentemente incolori nel preparato.

Alla fine di questa comunicazione mi consentirà l' Accademia fare alcune osservazioni sull' ultima parte della memoria del Prof. Boccardi " *Sulla evoluzione degli eritroblasti* „ comunicata il 2 scorso febbraio a questa stessa Accademia: se io vi fossi stato presente, avrei risposto, nella parte che mi riguarda, nel modo seguente:

1.° I preparati microscopici dal Boccardi esposti e da me osservati nella stessa adunanza prima di assentarmi, confermano quello che io già aveva precedentemente pubblicato in varie memorie; e perciò non mi pare che vi sia profonda differenza tra le mie e le sue osservazioni: ed io sono grato al collega, il quale ha potuto con ricerche ulteriori illustrare una parte di questi miei studi: e veramente egli mi disse alla presenza di vari suoi allievi, quando desiderò alcuni mesi addietro nell' Istituto anatomico l' esposizione dei miei preparati, nell' osservare i 2 primi di sangue estratto e fissato nell'acido osmico 1: 4000, e poi colorati uno col formio-carminio, l'altro col *bleu fin* formico, che egli era lieto potermi dichiarare, che le sue ricerche fatte sugli eritroblasti, specialmente del midollo osseo, confermavano le mie vedute sulla doppia sostanza acidofila e basofila del loro nucleo. Non ho potuto spiegarmi, perchè dopo il Boccardi abbia detto quì l' opposto: a me pare, che sostanzialmente le sue ricerche confermano le mie.

2.° Che il corpicciuolo da me descritto ed interpetrato variamente in lavori successivi, per ragioni inerenti alla progressività della ricerca, non si può oggi più ritenere, che coesista col nucleo degli eritroblasti, come si ritenne dal Negri nel laboratorio del Golgi, ed anche da me. Nelle ricerche ulteriori ho potuto dimostrare, ed è oramai un fatto fuori discussione, che il reperto di quel corpic-

ciuolo fuori del nucleo degli eritroblasti è soltanto artificiale, cioè per spostamento, procurato da' reagenti sul globulo vivo, di quella massa a funzione basica (acidofila), contenuta insieme alla massa a funzione acida (basofila) nel nucleo stesso. Quando gli eritroblasti sono morti pel semplice essiccamento, con l'ulteriore fissazione definitiva le 2 sostanze restano insieme nel nucleo. Tutto questo ho detto e ripetuto varie volte ed in modo molto esplicito nella memoria " *Ultime ricerche sul sangue* — Atti dell' Accademia Gioenia di Catania — Serie 4ª Vol. XIV ".

3.° Il più assoluto riserbo del collega Boccardi, per la reazione ferrica da me messa avanti, io stesso aveva fatto intravedere; anzi nelle ricerche precedenti io aveva ritenuto, quando conchiusi alla azione dell'acido solforico, che vi abbisognasse anche un composto di ferro. Più tardi risultava da altre mie ricerche, che l' acido solforico da solo fosse sufficiente a produrre la reazione: però dichiarai nettamente, che per avere la reazione perfetta e costante giovava l'aggiunta di un composto di ferro, ed in ispecie del percloruro. Ho potuto in seguito con varie qualità di acido solforico puro ottenere la reazione, anche evitando tutti gli inquinamenti possibili di ferro; e se talvolta la reazione non si ottiene, dipende dalla dissoluzione fatta dalla nuova soluzione acquosa che si forma dall'anidride solforica residuale nel preparato dopo l'evaporazione dell' alcool: infatti se la lastrina stata nel bagno di alcool solforico si immerge, appena s'inizia l'essiccamento, di nuovo nell' alcool, immediatamente dallo stratarello di sangue si sprigiona una sostanza che colora in giallo-bruno l' alcool che sovrasta il preparato stesso.

E con ciò spero essermi scagionato dell'errore di metodo.

A proposito poi del lavoro del Dottor Orsi " *Intorno la reazione del Petrone sul sangue* " devo prima far notare, che la sua conclusione è la stessa di quella, a cui io pervenni un anno addietro e che è riportata in carattere corsivo nella mia memoria succennata " *Ultime ricerche sul sangue* ". Il Dottor Orsi avrebbe dovuto ricordarsi che le mie ricerche hanno continuato in seguito per ancora un anno. Ho detto infatti nei lavori successivi, perchè doveva ritenere che la reazione del sangue fosse dovuta al solo acido solforico (V. "*Il valore della reazione ferrica nella cellula sanguigna*". Atti della R. Acc. Med.-Chir. di Napoli Anno LV, N. IV). E più tardi nella comunicazione fatta all' XI Congresso di Medicina interna a

Pisa. " *Tecnica per i nuovi reperti del sangue e prime applicazioni cliniche* " aggiunsi di nuovo, che per avere la reazione costantemente dall'alcool solforico, giovava aggiungere una piccola quantità di percloruro secco di ferro, e ne diedi la formula.

Io mi proponeva di ricercare perchè con l' alcool solforico la reazione non era sempre netta e costante. Ed eliminate tutte le cause possibili di errore, ho potuto ottenere anche col solo alcool solforico, adoperando l'acido solforico puro di Merck, da lui impiegato, ottenere la reazione: anche quando questa non si ottiene chiara, si apprezza la frammentazione del nuovo composto, e se si prolunga la permanenza dei preparati nel bagno, anche la dissoluzione. Quindi la reazione si ha senza il contributo del ferro aggiunto, il quale coadiuva il risultato del reperto, soltanto perchè impedisce l'emolisi, come io già aveva pubblicato: d'altra parte ho potuto dimostrare, che anche coll' alcool solforico e percloruro di ferro non si ottiene alcun precipitato di cristalli nei preparati, se il sangue non vi mette la sua parte essenziale, come quando si è coagulato e reso insolubile precedentemente il contenuto dell'emasia: come del pari non si ha con gli altri tessuti semplicemente essiccati. Già il fatto, che i globuli bianchi e le piastrine non mostravano il reperto doveva mettere in guardia l'Orsi, quando i suoi preparati erano ben riusciti: era chiaro, che avverandosi la frammentazione e dislocazione del nuovo prodotto tutto poteva essere coverto da quella massa, anche lo spazio libero: così non gli sarebbe venuto il convincimento, che quel reperto fosse puramente passivo, come traspare dal suo scritto.

Che la reazione, o quel deposito si compia fuori il nucleo degli eritrociti, secondo l'Orsi, devo a lui consigliare di ottenere buoni preparati, e di ricordarsi che io stesso ho dimostrato, anche con figure, che quella massa si sloca e si può perciò trovare altrove, come facilmente si può seguire sotto il microscopio. Nei preparati riusciti, come quelli oggi esposti, e che io aveva mostrato pubblicamente varie altre volte, si vede chiaramente, che il reperto di quei cristalli sta entro il nucleo, non fuori: specialmente quando il nuovo composto è ancora allo stato precristallino, come sovente si ottiene specialmente con l'alcool solforico, il sito endonucleare del reperto appare evidente: cominciando la cristallizzazione, facilmente si frammenta e sposta. Dichiaro però, che non serbo alcun rancore verso il Dottor Orsi, che ha voluto addebitarmi la più elementare igno-

ranza nell' osservazione microscopica: quando si arriva ad una certa età, si ha più facilmente la virtù della tolleranza verso la poca esperienza giovanile. Esprimo però il vivo desiderio, che una buona volta noi del mezzogiorno lavorassimo di buon accordo aiutandoci scambievolmente: il campo della scienza è vasto e può soddisfar tutti; così uniti nel lavoro, non ci lamenteremmo della preminenza degli altri: anche da noi si ha la volontà e l'indirizzo pel lavoro serio; ma che si faccia con accordo benevolo, amichevole, ed il dislivello sarà scomparso.

Napoli, 11 Maggio 1902.